

Значення регуляторних Т-лімфоцитів у розвитку atopічного дерматиту у дітей

Чернишов П. В.

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ИХ МЕСТО В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА Чернышов П.В.

Клинический показатель SCORAD и уровни $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ Т-лимфоцитов были определены у детей с atopическим дерматитом. Были обнаружены повышенные уровни $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ Т-лимфоцитов и их позитивная корреляция с показателем SCORAD, внутриклеточной продукцией интерлейкина-4 и интерферона-гамма, экспрессией CCR4 и CD28+ Т-лимфоцитами.

REGULATORY T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS AND THEIR ROLE IN DEVELOPMENT OF IMMUNOPATHOLOGIC PROCESS Chernyshov P.V.

Levels of SCORAD and $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ T-lymphocytes have been studied in children with atopic dermatitis. The increased levels of $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ T lymphocytes and their positive correlation with SCORAD, intracellular IL-4 and IFN-gamma production, CCR4 and CD28 expression on T cells have been found.

Атопічний дерматит (АД) є однією з найбільш розповсюджених захворювань шкіри. Захворюваність на АД серед дітей та дорослих молодого віку сягає 15 % [4]. Рівновага між алергією та толерантністю в значній мірі залежить від регуляторних Т-лімфоцитів. Індукована алерген-специфічними регуляторними Т-клітинами толерантність є нормальною імунологічною відповіддю на дію алергенів у здорових осіб, що не мають схильності до atopії. Таким чином, у здорових осіб зберігається нормальна функціональна відповідь алерген-специфічних регуляторних Т-лімфоцитів, а у осіб, схильних до atopії, така відповідь є порушеною. Це підтверджувалось у хворих на астму, алергічний риніт, контактний дерматит та atopічний дерматит. Відповідно, відновлення порушеної алерген-специфічної відповіді регуляторних Т-лімфоцитів та досягнення толерантності вважається надзвичайно важливим для отримання гарних результатів лікування означених хвороб [16].

Спочатку регуляторні Т-лімфоцити було знайдено у мишей, а вже потім популяції регуляторних Т-лімфоцитів було ізольовано з периферичної крові, тимусу, лімфатичних вузлів та

пуповинної крові людини. Проте, функціонально ці клітини у мишей та людей майже не розрізняються [1]. Утворення натуральних регуляторних Т-лімфоцитів у тимусі потребує фактору транскрипції *Foxp3*; також значну роль в їх утворенні відіграють:

- головний комплекс гістосумісності клас 2;
- власні ліганди, що експресуються клітинами епітелію;
- тимічний стромальний лімфопоетин.

Foxp3 пригнічує IL-2 та інші цитокіни, підтримує анергію та супресивну функцію регуляторних Т-лімфоцитів. За рахунок різних супресивних механізмів, регуляторні Т-лімфоцити впливають на багато інших клітин (Т-лімфоцити, В-лімфоцити, дендритні клітини, натуральні кілери). У свою чергу, на проліферацію та функцію регуляторних Т-лімфоцитів впливають ліганди тол-лайн рецепторів та інші чинники [12]. Так, доведено, що механізм костимуляції CD28+ є важливим для розвитку та існування Т-регуляторних клітин [14, 15]. Регуляторні Т-клітини мають властивість експресувати рецептори, що відповідають за рух клітин, зокрема хемокіновий рецептор CCR4, який відповідає за хомінг до шкіри [6, 8].

Одним з найбільш показових маркерів регуляторних *T*-лімфоцитів є фактор транскрипції *Foxp3*. Існує також декілька інших типів регуляторних *T*-лімфоцитів; більшість з них виникає у відповідь на антигенну стимуляцію. На деяких з них наявна експресія *Foxp3*, а на інших – ні [13].

На початковому етапі регуляторні *T*-лімфоцити спробували визначати за наявністю експресії маркера *CD25* (інтерлейкін-2 рецептор) на поверхні *CD4+* лімфоцитів. Це виявилось проблематичним, бо маркер *CD25* мають також *T*-лімфоцити, які не є регуляторними клітинами, наприклад, під час активації імунної відповіді. Отже, лише частина клітин з фенотипом *CD4+CD25+* є регуляторними клітинами. Додаткове застосування вимірювання експресії *Foxp3* дозволило більш надійно ідентифікувати регуляторні *T*-лімфоцити (*CD4+CD25+Foxp3+* *T*-лімфоцити). Однак, *Foxp3* також тимчасово експресується на ефекторних *T*-лімфоцитах людини, які не є регуляторними клітинами. Саме через це, для більш точної ідентифікації регуляторних *T*-лімфоцитів, вчені використовують відсутність або низьку експресію поверхневого протеїну *CD127* (рецептор інтерлейкіну-7) у комбінації з наявністю маркерів *CD4* та *CD25* [17]. Експресія рецептора інтерлейкіну-7 (*CD127*) зворотно корелює з експресією *Foxp3* та супресивною функцією *T*-лімфоцитів-хелперів у людини. Виходячи з цього, було доведено, що *T*-лімфоцити-хелпери з низькою або негативною експресією *CD127* та високою експресією *CD25* є регуляторними *T*-лімфоцитами (*CD4+CD25^{high-intermediate}CD127^{low-negative}*) [9].

Регуляторні *T*-лімфоцити регулюють або пригнічують не тільки алергію, але й інші класи імунної відповіді, наприклад [18]:

- відторгнення трансплантату;
- імунологія пухлин;
- протимікробна відповідь.

Вивчення значення регуляторних *T*-лімфоцитів при АД є актуальною темою. Так, Carponi *et al* у своїй роботі визначали наявність регуляторних *T*-лімфоцитів у враженій шкірі хворих на АД та здорових волонтерів. У шкірі хворих на АД регуляторні *T*-лімфоцити знаходили у великих кількостях у сосочковому шарі дерми, периваскулярно та, в меншій кількості, у базальному шарі епідермісу. У зразках шкіри здорових волонтерів було знайдено поодинокі регуляторні

T-лімфоцити, що інфільтрували обидва шари дерми [3]. Група американських вчених виявила вірогідне збільшення регуляторних *T*-лімфоцитів у периферичній крові дорослих хворих на АД у порівнянні з хворими на бронхіальну астму та здоровими донорами, та показала, що у хворих на АД клітини з маркерами, що відповідають за хомінг до шкіри, частіше експресували властиві регуляторним *T*-лімфоцитам маркери, ніж такі клітини у хворих на бронхіальну астму та у здорових донорів. У цій же роботі дослідники показали, що хворі на АД мали підвищені рівні регуляторних *T*-лімфоцитів з нормальною імуносупресивною активністю, але після стимуляції суперантигеном ці клітини втрачали свою імуносупресивну активність. На підставі отриманих даних дослідники припускають наявність механізму, за рахунок якого суперантигени змінюють активацію *T*-лімфоцитів у пацієнтів з АД [11].

У дослідженні японських вчених рівні регуляторних *T*-лімфоцитів у периферичній крові дорослих хворих на АД також були вірогідно вищими, ніж у осіб без атопії. Цими ж вченими у хворих на АД була встановлена кореляція регуляторних *T*-лімфоцитів з клінічним показником *SCORAD* та рівнями еозинофілів у периферичній крові. Досліджувані клітини як у хворих на АД, так і в здорових донорів мали слабку здатність до продукції інтерферону-гамма та інтерлейкіну-4. Також не було знайдено відмінностей у супресивних здатностях регуляторних *T*-лімфоцитів між хворими на АД та здоровими донорами. При цьому, рівні регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД знижувались після покращення клінічних проявів на шкірі [7]. Берлінські вчені досліджували регуляторні *CD4+CD25+CD127^{low}* *T*-лімфоцити у хворих на АД, які лікувалися низькими дозами циклоспоринолу А. За їх даними, у хворих на АД, що лікувалися циклоспорином А, рівні регуляторних *T*-лімфоцитів були вірогідно вищими, ніж у групи здорових донорів. Вчені повідомили також про зниження здатності *T*-лімфоцитів до активації та вірогідне підвищення відсоткових та абсолютних рівнів регуляторних *CD4+CD25+CD127^{low}* *T*-лімфоцитів після початку застосування хворими циклоспоринолу А. Супресивні властивості *T*-регуляторних клітин у пацієнтів з АД не відрізнялися від здорових донорів, але мали властивості хомінгу до шкіри. Автори вказаного дослідження, навіть, пояснюють

механізм дії циклоспорину А при АД за рахунок впливу на регуляторні Т-лімфоцити [2]. Даних про дослідження $CD4+CD25+CD127^{low}$ регуляторних Т-лімфоцитів у дітей практично не існує, тоді як відомо, що АД у переважній більшості випадків починається з раннього дитячого віку.

Метою нашого дослідження було визначити рівні регуляторних Т-лімфоцитів у хворих на АД дітей, перевірити наявність кореляційних зв'язків цих клітин з:

- тяжкістю клінічних проявів дерматозу;
- внутрішньоклітинною продукцією цитокінів;
- маркерами клітинного хомінгу та костимуляції.

Матеріали та методи дослідження. Ми спостерігали хворих на АД дітей, діагноз яким встановлювався на підставі критеріїв, запропонованих Hanifin та Rajka [5]. Для об'єктивізації тяжкості клінічних проявів АД застосовували клінічний інтегральний показник SCORAD. Підрахунок показника SCORAD проводився за стандартною методикою [13]. Обстеження проводилося перед початком лікування; у всіх дітей визначали рівні регуляторних клітин з фенотипом $CD4+CD25^{high-intermediate}CD127^{low-negative}$ (у подальшому цитуванні $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$), $CD3/CD4/CCR4$, $CD3/CD28/CD57$ -, внутрішньоклітинну продукцію Т-лімфоцитами-хелперами інтерлейкіну-4 та інтерферону гамма за допомогою багатокольорової проточної цитометрії у периферичній крові. В якості контролю використовували показники 11 дітей такого ж віку без ознак atopії. На обстеження дітей та використання результатів для аналізу і публікацій було отримано згоду батьків.

Результати досліджень оброблялися за допомогою математичної статистики. Для оцінки вірогідності різниці показників дітей з АД від групи контролю застосовували непарний t тест з поправками Велча. Різницю показників вважали вірогідною при $p < 0,05$. Кореляційні зв'язки визначали за допомогою непараметричного методу за Спірманом.

Результати досліджень та їх обговорення. Середній рівень регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у периферичній крові хворих на АД дітей дорівнював $213,32 \pm 17,18 \times 10^6$ клітин/літр. Відсотковий рівень цих клітин у хворих на АД пацієнтів дорівнював $8,90 \pm 0,33$ %. Середнє значення клінічного показника SCORAD у обстежених нами

дітей з АД дорівнювало $26,11 \pm 2,46$.

Відсоткові значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ вірогідно корелювали з віком дітей, хворих на АД ($r=0,50$; $p < 0,01$). Абсолютні значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ не мали статистично вірогідного кореляційного зв'язку з віком обстежених пацієнтів, але вірогідно корелювали з клінічним показником SCORAD ($r = 0,33$; $p < 0,05$).

Встановлено статистично вірогідну кореляцію абсолютних показників регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ з рівнями внутрішньоклітинної продукції інтерлейкіну-4 ($p < 0,01$), інтерферону-гамма ($p < 0,05$) та експресією хемокинового рецептору CCR4 ($p < 0,001$) Т-лімфоцитами-хелперами, костимулюючою молекулою CD28 на Т-лімфоцитах ($p < 0,001$).

Середнє значення відсоткового рівня регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у дітей без atopії дорівнювало $8,08 \pm 0,88$ %, а середнє абсолютне значення цих клітин дорівнювало $146,82 \pm 14,02 \times 10^6$ клітин/літр.

Абсолютні значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ були вірогідно вищими у дітей, хворих на АД, ніж у дітей без atopії ($p < 0,01$). Відсоткові значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ також були вищими у дітей, хворих на АД, але різниця не сягнула межі статистичної вірогідності.

Збільшена кількість регуляторних Т-лімфоцитів у периферичній крові хворих на АД дітей, яку ми встановили у своїй роботі, є додатковою підтримкою результатів інших дослідників, що показали підвищені рівні регуляторних Т-лімфоцитів як у периферичній крові, так й безпосередньо у вогнищах висипань на шкірі дорослих пацієнтів з АД. Сама наявність підвищеного рівня регуляторних Т-лімфоцитів у хворих на АД вказує на потенційно підвищений рівень захисту від розвитку аутоімунних та інфекційних процесів у таких хворих. У той же час, дані світової наукової літератури щодо розповсюдженості мікробних та аутоімунних процесів серед хворих на АД свідчать скоріше про зворотне. Виходячи з того, що, не зважаючи на підвищений у хворих на АД рівень регуляторних Т-лімфоцитів, захворюваність на аутоімунні та

інфекційні захворювання серед них щонайменше не нижча, ніж у популяції в цілому, можливо зробити висновок, що виникнення atopії в жодному разі не зводиться до простої нестачі регуляторних *T*-лімфоцитів. Натомість, можливо припустити, що у хворих на АД регуляторні *T*-лімфоцити мають певні відмінності у своїх властивостях, або що при atopії виникають такі реакції, які потребують компенсаторного збільшення цих клітин. Відомі на сьогодні спроби знайти які-небудь відмінності у властивостях регуляторних *T*-лімфоцитів хворих на АД та осіб без atopії не були успішними.

Встановлена нами пряма кореляційна залежність рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ з віком пацієнтів вказує на постійне зростання цих клітин разом із розвитком дитини та, зокрема, розвитком її імунної системи. Такий результат повністю вкладається в сучасне уявлення щодо функцій регуляторних *T*-клітин, бо з віком набагато збільшується ризик виникнення та розвитку в організмі аутоімунних процесів, неухильно зростає й кількість мікробних агентів, з якими контактує людина і на які виникає певна імунна відповідь.

Відносно низький рівень кореляційної залежності між рівнями регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ та тяжкістю клінічних проявів АД на шкірі хворих вказує на те, що вказані клітини не є ранніми маркерами запалення при АД. Отже, збільшення кількості регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у хворих на АД дітей обумовлено не стільки інтенсивністю запальної реакції у даний період часу, а скоріше наявністю у пацієнтів схильності до atopії як такої. Тобто, згадана нами схильність до atopії проявляється в організмі-власникові, зокрема, у вигляді низки імунологічних реакцій, які є відмінними від таких у осіб без atopії. Одним з наслідків цього є й встановлене нами підвищення рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у хворих на АД дітей. Таким чином, можливо припустити, що підвищення регуляторних *T*-лімфоцитів у більшій мірі пов'язане саме з хронічним перебігом АД, а не з періодичними загостреннями цього захворювання.

У цьому сенсі дуже важливим є проведене в нашій роботі дослідження зв'язків регуляторних *T*-лімфоцитів з іншими важливими ланками

імунопатологічного процесу при АД, зокрема, кореляція рівнів регуляторних клітин з рівнями внутрішньоклітинної продукції властивого для імунної відповіді *T*-хелперів:

- другого типу цитокіну – інтерлейкіну-4;
- першого типу цитокіну – інтерферону-гамма.

Більш виражена кореляція виявилася саме з внутрішньоклітинною продукцією інтерлейкіну-4, що відображає притаманний АД тип відповіді *T*-хелперів другого типу. Про наявність потужного зв'язку регуляторних *T*-лімфоцитів з імунною відповіддю *T*-хелперів другого типу свідчить й кореляція цих клітин з експресією властивого для відповіді *T*-хелперів другого типу хемокінового рецептора *CCR4* на *T*-лімфоцитах-хелперах. Наявність такої кореляційної залежності вказує на те, що чим більше синтезується регуляторних *T*-лімфоцитів, тим більше їх спрямовується до вражених ділянок на шкірі пацієнтів. У свою чергу, потужна кореляція рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з експресією молекули *CD28* доводить на практиці важливість механізму коstimуляції *CD28* для синтезу регуляторних *T*-лімфоцитів при atopічному дерматиті.

Отримані нами дані у сукупності з даними наукової літератури дають підстави зробити висновок про те, що кількість регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД теоретично може знижуватися при відтворенні стану толерантності і, відповідно, послабленні atopії, але це зниження є вторинним явищем і не повинно бути значним у порівнянні з рівнями регуляторних *T*-лімфоцитів у осіб без atopії. Значне ж падіння рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів є небезпечним через підвищення ризику виникнення аутоімунних, інфекційних хвороб та порушення протипухлинного імунітету. Це, у свою чергу, доводить небезпечність та, ймовірно, недоцільність застосування медикаментозних засобів, вибірково спрямованих проти регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД. Скоріш за все, можливий терапевтичний результат від застосування таких засобів буде значно нижчим за можливі побічні ефекти, пов'язані насамперед з порушенням захистом від аутоімунних та інфекційних процесів. Важливим науковим та практичним завданням є дослідження впливу існуючих терапевтичних засобів на динаміку регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Baecher-Allan C.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells / C. Baecher-Allan, V. Viglietta, D.A. Hafler // *Semin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, No 2. – P. 89-98.
2. *Low-dose cyclosporine A* therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis / C. Brandt, V. Pavlovic, A. Radbruch *et al* // *Allergy.* – 2009. – Vol. 64, No 11. – P. 1588-1596.
3. *FoxP3*-expressing T regulatory cells in atopic dermatitis lesions / M. Caproni, E. Antiga, D. Torchia *et al* // *Allergy Asthma Proc.* – 2007. – Vol. 28, No 5. – P. 525-528.
4. *ETFAD/EADV* eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis / U. Darsow, A. Wollenberg, D. Simon *et al* // *JEADV.* – 2010. – Vol. 24. – P. 317-328.
5. *Hanifin J.* Diagnostic features of atopic dermatitis / J. Hanifin, G. Rajka // *Acta Derm. Venereol.* – 1980. – Vol. 92. – P. 44.
6. *The majority* of human peripheral blood CD4+CD25 high Foxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors / K. Hirahara, L. Liu, R. A. Clark *et al* // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 4488-4494.
7. *Expansion* of FOXP3- positive CD4+CD25+ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis / Y. Ito, Y. Adachi, T. Makino *et al* // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2009. – Vol. 103, No 2. – P. 160-165.
8. *Lim H.W.* Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells / H.W. Lim, H.E. Broxmeyer, C.H. Kim // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 840-851.
9. *CD127* expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Tregs / T. Liu, A. L. Putnam, Z. Xu-yu *et al* // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1701-1711.
10. *Tregulatory* cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens / L.S. Ou, E. Goleva, C. Hall, D. Y. Leung // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, No 4. – P. 756-763.
11. *Naturally* occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease / G. Raimondi, M. S. Turner, A. W. Thomson, P. A. Morel // *Crit. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 27, No 1. – P. 61-95.
12. *Rouse B.T.* Regulatory T cells in health and disease / B. T. Rouse // *J. Int. Med.* – 2007. – Vol. 262, No 1. – P. 78-95.
13. *Severity* scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic dermatitis // *Dermatology.* – 1993. – Vol. 186. – P. 23-31.
14. *CD28* costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 / X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, A. Singer // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 152-162.
15. *Cutting edge:* CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells / Q. Tang, K. J. Henriksen, E. K. Boden *et al* // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 3348-3352.
16. *Scientific* rationale for the Finnish Allergy Programme 2008-2018: emphasis on prevention and endorsing tolerance / L. C. von Hertzen, J. Savolainen, M. Hannuksela *et al* // *Allergy.* – 2009. – Vol. 64, No 5. – P. 678-701.
17. *Wikipedia* contributors. Regulatory T cell. Wikipedia, The Free Encyclopedia. - October 10, 2009, 01:37 UTC. - Available at: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Regulatory_T_cell&oldid=318983121
18. *Yamazaki S.* Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory cells / S. Yamazaki, R. M. Steinman // *J. Dermatol. Sci.* – 2009. – Vol. 54, No 2. – P. 69-75.